

摘 要

查尔酮合酶 (Chalcone synthase, CHS) 是类黄酮合成途径中的一个关键酶。CHS 表达量的增加或减少都可能导致植物花色的变异。本实验利用 RT-PCR 方法克隆查尔酮合酶基因 (CHS) 的 cDNA, 通过两步的克隆, 构建在植物中表达 CHS 的植物双元表达载体 p1301B Ω C。并以农杆菌介导将 CHS 导入莒萝中, 初步建立了莒萝的遗传转化系统, 为今后莒萝遗传改良的进一步研究奠定基础。主要结果如下:

(1) 以即将开放的中国水仙的花蕾为材料, 采用异硫氰酸胍—苯酚—氯仿法提取 RNA, 反转录成 cDNA 后用特异引物 PCR 扩增出 1.2kb 左右的片段。核酸序列分析表明, 该片段的编码区长 1167bp, 编码 389 个氨基酸。与已知的植物 CHS 核苷酸同源率均达 80% 以上, 氨基酸同源率高达 85%。实验结果证明该片段即为中国水仙的 CHS cDNA。

(2) 为了能在植物中表达 CHS, 通过一步的中间克隆, 将 CHS 连上 Camv 35s 启动子和 nos 终止子。进一步将重组片段插入植物表达载体 pCAMBIA1301, 酶切及测序结果都证明植物双元表达载体 p1301B Ω C 构建获得成功。

(3) 建立了莒萝的基因转化受体系统。在没有前人的工作基础上, 摸索了莒萝脱分化和分化的条件。实验认为莒萝子叶愈伤组织诱导培养基为 MS+6-BA 0.5 mg/L+2,4-D 2 mg/L, 胚轴愈伤组织诱导培养基为 MS+6-BA 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L。愈伤组织分化培养基为 MS+6-BA 2 mg/L。

(4) 初步建立了农杆菌介导的莒萝遗传转化体系。实验结果表明叶盘法不适合莒萝的遗传转化。而 GUS 检测表明莒萝的疏松愈伤组织有较高的遗传转化率。为了进一步验证莒萝的转化, 进行了分子检测实验。以载体 T-DNA 上的一段 DNA 设计一个引物, 以 CHS 上的一段 DNA 为另一个引物, 进行 PCR 检测。同时, 还以 DIG 标记的 Camv 35s 上的一段为探针进行 Southern 点杂交和 PCR—Southern 杂交。二者都进一步证实了 CHS 基因已整合到莒萝基因组中。

关键词: 查尔酮合酶基因 中国水仙 莒萝 遗传转化

Molecular Cloning Chalcone Synthase Gene and Studies on Genetic Transformation of *Quamocliy pennata* by *CHS* Gene*

ABSTRACT

Chalcone Synthase (*CHS*) is a key enzyme in the biosynthesis of all classes of flavonoids. Increase or decrease its expression in plant would change flower color. We cloned the cDNA sequence of *CHS* gene from *Narcissus* by RT-PCR and constructed plant expression vector p1301BΩC by one median clone. At the same time, we transferred *CHS* to *Quamocliy pennata* by *Agrobacterium* mediated and established genetic transformation system of *Quamocliy pennata* through the guide of *GUS* reporter gene. The main results are as below.

1. We extracted RNA from *Narcissus*, cloned the cDNA sequence of *CHS* gene by RT-PCR and analyzed the coding sequence of gene. The result demonstrates that the sequence of the coding region is 1167bp, encodes a protein of 389 amino acid. The homology between *Quamocliy pennata* *CHS*'s cDNA and other plant's is above 80%, 85% between amino acid.

2. In order to express *CHS* in plant, we constructed plant expression vector p1301BΩC. First added Camv 35s promoter and nos terminator to *CHS* by one median clone. And then ligated the whole fragment into plant expression vector

pCAMBIA-1301. The result of identification of restriction Sites of p1301BQC and the sequence examination showed that the construction was successful.

3. Tissue culture procedure in the *Quamocliy pennata* genetic transformation was developed. Cotyledon produce callus in MS+6-BA 0.5 mg/L+2,4-D 2 mg/L and hypocotyl produce it in MS+6-BA 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L. Callus initiate in MS+6-BA 2 mg/L.

4. Established efficient transgenic technology of *Quamocliy pennata*. Gus examinaton showed that the rate of transgene was higher. And PCR analysis ,PCR-Southern and Southern analysis all showed that *CHS* was intigrated into *Quamocliy pennata* chromosome successfully.

Key words: Chalcone Synthase gene, *Quamocliy pennata*,
Narcissus tazetta , Genetic Transformation

略 缩 词

CHS (chalcone synthase)	查尔酮合酶
DFR (dihydroflavono1-4-reductase)	二氢黄酮醇-4-还原酶
Cef (cefotaxime sodium)	头孢噻呋钠
Hyg (hygromycin B)	潮霉素 B
HPT (hygromycin phosphotransferase)	潮霉素磷酸转移酶
Kan (kanamycin)	卡那霉素
Amp (ampicillin)	氨苄青霉素
Cb (carbenicillin)	羧苄青霉素
AS (3,5-dimethoxy-4-hydroxy acetophenone)	乙酰丁香酮
GUS (β -glucuronidase)	β -葡糖醛酸糖苷酶
6-BA (6-benzylaminopurine)	6-苄基氨基嘌呤
KT (kinetin)	激动素
NAA (naphthalene acetic acid)	萘乙酸
BSA (bovine serum albumin)	牛血清白蛋白
LB	Luria-Bertani 培养基
GET	葡萄糖/Tris/EDTA 溶液
2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid)	2,4-二氯苯氧乙酸
Npt-II (neomycin phosphotransferase-II)	新霉素磷酸转移酶
CTAB (cetyltriethylammonium bromide)	十六烷基三甲基溴化铵
PCR (polymerase chain reaction)	聚合酶链式反应
X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide)	5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-葡糖苷酸

前 言

1.1 基因工程改良花卉的性状的研究进展

多年来, 育种学家及爱好者利用传统的杂交育种及定向选择育种, 培育出了大量观赏植物的新品种, 但这种育种方法有其局限性: 在自然条件下, 植物变异频率较人类所需要的要小得多; 人工诱变虽然提高了变异频率, 但结果仍不够理想, 且盲目性比较大; 杂交育种虽然能弥补两者的不足, 却也存在着远缘杂交不亲合, 难以打破物种生殖隔离, 以及在有性生殖过程中, 重组时染色体的交换量很小, 难以打破某些基因连锁等缺点。这些缺点导致采用杂交育种方法育成一个新品种, 往往需要经过多年多次杂交, 育种周期过长, 有时还会使某些优良性状难以保持, 给改良某一单一性状带来了极大的不便。不断成熟的生物技术, 特别是基因工程技术, 可以解决一些传统育种不能突破的问题, 为花卉性状改良提供全新的思路。与传统育种方法相比, 基因工程技术具有独特优势: 可以定向修饰花卉的某些目标性状并保留其它原有性状; 大大地扩展了育种的范围, 打破了物种之间的生殖隔离障碍, 实现了基因在生物界的共用性, 丰富了基因资源及植物品种。尽管用基因工程技术进行花卉的改良只有二十多年的时间, 但花卉基因却已取得了长足的进展, 在株型、花色、彩斑、重瓣性、花形等的形成机理取得一定突破的基础上, 基因工程技术在改良部分观赏植物花色、花形、株型、花香及延长瓶插寿命等方面取得了重要进展。

1.1.1 花色基因工程

在花色基因工程中, 花青素生物合成途径中几乎所有的结构基因, 已利用蛋白质纯化, 转座子标签, PCR 及差异显示等手段分离克隆出来 (见表 1)。调节基因主要采用转座子技术和以已有的基因为探针的方式分离克隆 (见表 2)。在调节基因中, R、Sn、Ls 和 B 基因的序列相似, C1 和 P1 基因也属同源; Del 基因与玉米 R 基因序列高度相似; An2 基因序列又与玉米的 C1 和 P1 基因高度相似。(周音等, 2000) 可见, 不同物种中花青素的生物合成由相似的因子介导。通过对这些基因的遗传操作, 有可能改变花的色素合成和积累, 从而改变花色。

表 1 植物花色素苷结构基因的分离和克隆

Table1 Isolation and cloning of structural genes related to anthocyanins synthesis

结构基因 Structural gene	分离和克隆的方法 (Method of isolation and clone)	所用植物 Plant	克隆时间 Cloning date
<i>CHS</i>	鉴别筛选与杂交筛选 (Differential screening and screening by hybridization)	欧芹(<i>Petroselinum hotense</i>)	1983 (Kreuzaler F)
CHS	以欧芹 <i>CHS</i> 基因为探针 (Recombination probe)	矮牵牛(<i>Petunia</i>)	1985 (Reif HJ)
CHI	利用抗体技术 (Antibody technology)	法国豌豆(French bean)	1987 (Mehdy MC)
CHI	抗血清方法 (Antiserum method)	矮牵牛(<i>Petunia</i>)	1988 (Van Tunen AJ)
F3H	鉴别筛选与基因图谱 Differential screening and gene mapping	金鱼草(<i>Antirrhinum</i>)	1991 (Martin C)
F3H	酶纯化法 (Enzyme purification)	矮牵牛(<i>Petunia</i>)	1992 (Britsch L)
F3H	以矮牵牛 <i>F3H</i> 基因为探针 (Recombinationprobe)	康乃馨(Carnation) 翠菊(<i>Callistephus</i>) 紫罗兰 (<i>Matthiola</i>)	1993 (Britsch L)
F3'5'H	PCR 扩增技术 (PCR amplification)	矮牵牛(<i>Petunia</i>)	1993 (Holton TA)
DFR	转座子标签技术 (Transposon tagging)	玉米(Corn) 金鱼草(<i>Antirrhinum</i>)	1985 (Oreilly C)
DFR	以金鱼草 <i>DFR</i> 基因为探针 (Recombination probe)	矮牵牛(<i>Petunia</i>)	1989 (Beld M)
ANS	转座子标签技术 (Transposon tagging)	玉米(Corn) 金鱼草(<i>Antirrhinum</i>) 矮牵牛(<i>Petunia</i>)	1990 (Messen A)
3GT	转座子标签技术 (Transposon tagging)	玉米(Corn)	1984 (Fedorff NV)
CHSA	PCR 扩增技术 (PCR amplification)	矮牵牛(<i>Petunia</i>)	1996 (邵莉)
3GT	以玉米 <i>3GT</i> 基因为探针 (Recombination probe)	金鱼草(<i>Antirrhinum</i>)	1991 (Martin C)

表 2 植物花色素苷调节基因的分离和克隆

Table2 Isolation and cloning of regulatory genes related to anthocyanins synthesis

调节基因 (Regulatory gene)	所用植物 (Plant)	克隆时间 (Cloning date)
<i>R</i>	玉米(Corn)	1988 (Dellaports SL)
<i>S</i>	玉米(Corn)	1989 (Perrot GH)
<i>Sn</i>	玉米(Corn)	1991 (Tonelli C)
<i>Lc</i>	玉米(Corn)	1989 (Ludwing SR)

<i>B</i>	玉米(Corn)	1989 (Chandler VL)
<i>Cl</i>	玉米(Corn)	1986 (Cone KC)
<i>PL</i>	玉米(Corn)	1989 (Mc Carty DR)
<i>VpL</i>	玉米(Corn)	1986 (Pas Ares J)
<i>DeL</i>	金鱼草(Antirrhinum)	1992 (Goodrich J)
<i>An2, An4</i>	矮牵牛(Petunia)	1994 (Quattrocchio F)
<i>TED3</i>	百日草(Zinnia)	1998 (Igarashi M)
<i>GTCHS1</i>	龙胆(<i>Gentiana</i>)	1998 (Kobayashi H)
<i>DEF</i>	金鱼草(Antirrhinum)	1997 (Samach A)

目前采用基因工程改变植物花色的方法主要有以下几种。

(1) 直接导入外源结构基因

在单基因控制的花色中，如果某物种或品种本身缺乏该基因，可直接导入外源结构基因以改变花色。国际上第一例应用基因工程改变花色的实验便是采用此法。将玉米二氢黄酮醇—4—还原酶 (DFR dihydroflavonol—4—reductase) 基因导入矮牵牛 *RC01* 突变体后(Meyer P)，二氢黄酮醇还原，形成天竺葵色素生物合成的中间产物，花变成淡砖红色，生成矮牵牛的新花色系列。在蓝花基因工程中，F3'5'H 酶的基因 *Hf1* 和 *Hf2* 已克隆 (Holton T.A. et al, 1993)，这两个基因的表达都能使花色素苷生物合成趋向于产生翠雀素—3—葡萄糖苷，从而使花色显蓝。如将 *F3'5'H* 基因引入合成花葵素苷和花青素苷而缺乏翠雀素—3—葡萄糖苷的玫瑰栽培品种里，花色素苷的合成转向翠雀素苷的合成，使花显蓝。

(2) 导入调节基因使植物内源基因活化

在花瓣发育过程中花色素苷的合成主要通过合成酶量增加的方法来实现。而合成酶的增加则是由于这些酶基因转录的增加所致。目前，已发现了不少调控类黄酮生物合成途径中酶的结构基因的调控基因 (Jorgesen R.A., 1995)。当植物本身含有花色素代谢的结构基因，如果由于组织特异性或缺乏调节基因表达产物的激活而不表达时，则可采用导入调节基因并使其适当表达而改变植物花色。黄酮醇辅色素的存在可以加深蓝色。Holton 等 (1993) 报道从矮牵牛已克隆并表达了辅色素黄酮醇合酶基因 *F1*，增加这种辅色素通常也会使花的蓝色加深。

(3) 导入已存在于植物正义或反义的基因以抑制内源基因的活性

1990 年，美国和荷兰的科学家发现，当植物体内导入的结构基因不止一个拷贝时，转基因植物的内源基因常被抑制。Napoli 等 (1990)、Van der krol

等(1988)、Jorgenson(1995)及Blokland(1994)等的研究表明,当查尔酮合酶(CHS, chalcone synthase)基因以多拷贝导入植物体内后,植株的内源CHS便局部或全部不能表达,从而改变花色。Van der Krol A.R.等(1988)同时研究了DFR基因的这种共抑制现象。反义基因的方法是将某一基因反向插入植物表达载体,然后导入植物体内,这种反向DNA转录RNA之后,与内源的互补mRNA结合,导致mRNA不能合成蛋白,进而造成花色的变化。1988年荷兰自由大学在世界上首先采用此法获得了矮牵牛花色变异新品种(Van der Krol AR et al, 1988)。Ryutaro A(2000)等将反义DFR和反义CHS导入蓝猪耳中,二者都可使花更显蓝。反义DFR比反义CHS更能使花显蓝。他们认为,通过导入反义DFR,使DFR基因钝化,从而导致黄酮的积累,使辅色作用增强。这是导入反义DFR比导入反义CHS更加显蓝的原因。

(4) 其他方法

此外,辅色素及液泡的pH值对蓝色素的形成也有影响。液泡液中pH接近7时花显蓝色,pH较低时花趋向显红,pH较高趋向显白色。De Vlaming等(1983)确定矮牵牛花瓣细胞中控制pH值的是基因 $ph1-ph6$,Chuck G等(1993)已将 $ph6$ 基因进行了克隆。

1.1.2 花形基因工程

花的基本结构是由两个分开的阶段所决定的:器官发育初期的等同性和花分生组织中器官发生的位置。

分子和基因的研究表明器官发育初期的等同性是由一系列同源异型基因所决定的。这些基因以部分重叠表达的方式来编码转录因子(Ma,H., 1994; Weigel, D. et al, 1994)。当这些同源异型基因被异位表达以获得功能,或被反义RNA或共抑制所抑制失去功能(Angenent G. C. et al, 1994),花器官的等同性将被改变。而花器官的等同性是一个保守的过程,一个种类花器官的等同基因可以有效地改变另一种类花的结构(Mandel M.A et al, 1995)。这个过程已被深入的研究,通过改变同源异型基因的表达方式,按人们需要设计新的花形状已成为可能。

许多切花植物都有固定的花序,相反的,金鱼草,拟南芥和牵牛花都有不固定的花序,即可以产生无限的花。在这三种花,一个基因的突变就有可能导致花序从无限性转变为有限性(Coen E. S. et al, 1991),从而克隆出花序类型

基因。这方面基因分离与克隆工作主要是在拟南芥和金鱼草等植物中进行 (Krol A.R. et al, 1997)。法国与德国合作将某种基因导入蔷薇和菊花,使其枝数增加,花数大幅度提高,增加了切花数量,但未公开该基因是什么 (苏焕然等, 1996)。

Luo D 等 (1996) 发现金鱼草的 *CYC* 和 *DICH* 基因对花形状的形成起关键作用: 基因正常作用时, 金鱼草花发育成不规则型; 当基因发生变异时, 花就发育成规则型。他们克隆了其中控制花卉形状的 *CYC* 基因。利用转基因技术抑制一种 *AG* 基因的表达, 结果花的雄蕊被花瓣取代, 心皮被新的花取代, 形成多重瓣花 (Coen E.S. et al, 1994), 这为观赏园艺设计创造更丰富的重瓣花提供了发展前景。抑制另一种 *API* 基因的表达, 结果花萼被叶片取代, 形成无花瓣的花。在金鱼草和拟南芥中对控制花发育的多种同源异型基因的分离克隆, 已使人们在控制四种花器官的发育方面前进了一大步。

1.1.3 花期调控基因工程

通过控制同源异型基因在花发育过程中的表达, 也可以用来改变植物的花期。常花的形成需要分生组织特征基因 (如 *LFY*, *API* 等) 的表达。当花分生组织特征基因的超表达, 就可以加快花发育, 使花期提前。在 *Camv 35S* 启动子控制下, 在转基因的拟南芥中使 *LFY* 基因表达, 明显地加快花发育, 花期提前, 大多数侧生枝发育成花 (Weigel D et al, 1995)。将 *LFY* 基因与 *35S* 启动子的嵌合基因导入烟草和杂种杨后使这些植物提早开花。特别是杨树, 通常 8—10 年后才开花, 但转基因杨在经 6—7 月的营养生长后, 即形成顶花以及单个的腋生雄花 (Weigel D et al, 1995), 说明通过导入 *LFY* 基因, 有可能调控开花时间。同样通过控制基因 *API* 超表达, 转基因拟南芥花期明显提早 (Mandel MA et al, 1995)。*CO* 是成花的重要计时基因, 其产物达到一定域值时, 明显促进成花。用转基因技术在拟南芥的 *co* 突变体中, 导入有 *35S* 启动子的 *CO* 基因及糖皮质激素基因, 然后用鼠的糖皮质激素 DEX 处理这一转基因植物, 即可诱导转入的 *CO* 基因的表达, 产生糖皮质激素受体蛋白和 *CO* 蛋白嵌合蛋白。而 *CO* 的表达又可迅速诱导 *LFY* 和 *TFL1* 基因的转录, 结果表现为: 在不同的时间用 DEX 处理, 可诱导转基因植物在不同的时间开花 (Simon R, 1996)。

1.1.4 株型基因工程

植物植株的大小和形状主要受植物激素的控制。转基因植物中的细胞分裂素与生长素的比例可以通过表达根癌农杆菌的 Ti 质粒或发根农杆菌的 Ri 质粒上的致癌基因而改变。比如：表达 Ri 质粒上的 *rolc* 基因（编码细胞分裂素- β -葡糖苷酶），将导致非活性的糖结合体释放有活性的细胞分裂素，促使植株的矮化（Schmilling T et al, 1994）。法国科学家用发根农杆菌在天竺葵上导入野生型 Ri 质粒，得到节间缩短，分枝和叶片增加，株态优良的天竺葵（Pellegrineshi A et al, 1994）。1995 年 Suginuma C 等（1995）用野生型发根农杆菌 MAFF03-01724 转化龙胆，转基因植株在茎基部具有节间伸长，侧枝生长旺盛，叶皱，减少了顶端优势，增加了根的斜向性。1995 年 Ross J.J.（1994）将 *Rol* 基因导入高原龙胆（*Eustoma grandiflorum*），使转基因植株矮小、叶皱、花冠呈杯形。

赤霉素能显著地促进植物的生长。赤霉素合成被改变的植物突变体或被喷洒了赤霉素阻碍剂的植株通常表现出节间缩短，矮化。通过喷洒赤霉素，突变体可以恢复为野生型。目前，赤霉素生物合成中的两个重要的基因 *gal*（Bensen, R.J. et al, 1995），*anl*（Sun, T.P et al, 1992）已被克隆。另外，八氢番茄红素合酶在合成类胡萝卜素时会与赤霉素合成途径中的酶竞争底物，因此，过量的表达八氢番茄红素合酶也可以达到改变株型的目的。

但是，通过改变激素配比来改变株型通常会产生一些不好的副作用，如花和叶缩小，植株的不育等，这已引起研究人员的重视。

1.1.5 抗衰老花基因工程

许多花卉在采摘后很快枯萎，瓶插寿命的短暂一直是花卉市场拓展的一大障碍。花卉衰老的生理研究是从香石竹开始，并一直以它为研究对象（Cook, E. L. et al, 1988）。研究结果表明，花冠的衰老是一个动态的过程，这个过程包括许多生化和生理变化。花瓣在衰老过程中呈现“in-rolling”的特征。通过加入银离子或细胞分裂素，in-rolling 的现象可被延迟，从而阻断乙烯合成的途径。

乙烯生物合成途径中，从 SAM 向 ACC 的转变，再向乙烯的转变，分别由 ACC 合成酶和 ACC 氧化酶催化（Adams, D. O et al, 1979）。Florigene Australia 公司将 ACC 合成酶基因反向导入香石竹（Aanhane T., 1995），使其保鲜期延长了两倍，并于 1995 年在 Australia 成功上市，成为世界上首次上市

的转基因切花。目前已从番茄 (Vander Stieaten D et al, 1998)、苹果 (Dong T.G. et al, 1991)、美国南瓜 (Huang P.L. et al, 1991)、拟南芥 (Bouzayen M et al, 1997)、康乃馨 (Handa T et al, 1995) 等植物中分离出 ACC 合成酶基因。该基因在矮牵牛 (Bouzayen M et al, 1997)、康乃馨 (Bovy A.G. et al, 1995)、中国水仙 (曾荣华等, 2001) 等花卉上转化成功。

还有其他一些途径可以抗衰老。比如, 西红柿中的乙烯由于过量表达 ACC 脱氢酶而降低 (Klee H. J. et al, 1991)。这是由于过量的 ACC 脱氢酶可以有效的与 ACC 氧化酶竞争底物 ACC。在烟草中转入异戊烯转移酶基因可以提高叶片中细胞分裂素的含量, 从而延缓叶片的衰老 (Smart, C.M. et al, 1991)。在花瓣中转入此基因也可能有抗衰老的作用。另外, 乙烯信号传导途径中关键基因的分离将为培育抗衰老花卉提供新的途径 (Zarembinski T. I et al, 1991)。

1.1.6 花香基因工程

虽然很多产生花香的化合物的化学结构已经被人们所了解, 但对它们生物合成的背景却了解得很少。因此花香基因工程研究进展缓慢。

单萜是产生花香的基本化学物质, 是通过单萜合成酶从天竺葵焦磷酸合成的。目前, 已有一种单萜合成酶基因 (S-linalool), 两种修饰单萜的基因被克隆 (Bolwell, G.P. et al, 1994)。1994 年法国研究人员 (Pellegrineshi A et al, 1994) 利用野生型发根农杆菌转化柠檬天竺葵 (*Lemongeranium*), 发现转化植株的芳香物, 牛儿醇 (Geraniol) 比对照植株增加 3~4 倍, 其它芳香物质如萜烯醇 (Linalool) 和桉树脑 (1,8-Eineole) 在转化植株中也有增加。这为香味基因工程提供了一条途径。

1.1.7 品质改良基因工程

1997 年瑞士科学家从黄水仙中分离到植物醇合成酶 (Phytoene synthase) 基因, 它可在缺胡萝卜素的植物体内合成维生素 A 前体。他们将该基因转入水稻, 获得富含 β -胡萝卜素的转基因水稻 (Buekhardt P.K. et al, 1997)。缩合单宁是衡量许多饲料作物营养和食品质量的重要因素。1997 年英国 (Bavage A.D. et al, 1997) 从金鱼草中克隆到二氢类黄酮还原酶 (DFR) 基因, 将该基因转入荷花中改变了荷花中缩合单宁的结构。

1.1.8. 商业化的转基因花卉

花卉业是当今世界上最具有活力的产业之一。全球花卉(切花及盆栽花卉)生产在 20 世纪已达工业水平,其销售量仍不断增加。从 1992 到 1993,全球花卉栽培中心的荷兰的花卉出口值增长了 4%,此后的出口量不断增长。同期,日本的花卉市场巨增了 50%,美国增加了 11% (Joseph N.M. et al, 1995)。花卉产业的兴旺和发达已成为一个国家富强文明的标志之一。

利用分子生物学技术将外源基因导入花卉植物,以获得性状改良的花卉已经成为现代花卉育种的趋势。只要性状基因可被克隆,能在靶植物中正常表达,并且靶植物可以转基因并再生,就有可能获得我们所需性状的转基因植物。但是,转基因花卉要商业化还须注意一些问题,①传代后转基因性状的稳定性②植株生长过程中性状的稳定性③转基因后原性状的维持。④安全性问题。如:转基因植物杂草化,基因漂移等问题。因此,即使有带有转基因性状的转基因花卉产生,在其进入市场前,还需较长一段时间的观察实验和环境影响检测。

1.2 花卉基因工程技术的研究

选择适宜的遗传转化的方法是提高遗传转化率的重要环节之一。尽管遗传转化的方法很多,但从遗传转化系统来说,一般可分成两类。一类是以载体为媒介的遗传转化,又称间接法;另一类是外源目的 DNA 的直接转化。

1.2.1 间接转化法

用于植物遗传转化的常用农杆菌有发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)和根癌农杆菌(*A. tumefaciens*),它们能分别把 Ri 和 Ti 质粒中的一段带有目的基因及报告基因的 T-DNA 转移并插入到植物细胞的染色体基因组中。在观赏植物中双子叶多用间接转化法。

此类方法在观赏植物的应用主要有,利用 At 向矮牵牛转入 *CHS* (邵莉等, 1996)、*CHR* (Davies K.M. et al, 1998)、*Dfr* (Oud J.S.N. et al, 1995) 基因以改变花色,1997, 导入 *EFE* 延长矮牵牛瓶插寿命 (Bouzayen M. et al, 1997)。1997 年,余沛涛等将生长素基因导入丝石竹并建立转化系统。1996 年, Nicolescu 等在白杨中导入 *CHSA* 基因后获得抗病性。在 1992 年和 1996 年分

别建立金鱼草 *Ar* 转化系统 (Handa T. et al, 1995) 和 *At* 转化系统 (余迪求) 的基础上将 *Bar* 导入金鱼草获得抗除草剂性能 (Hoshino Y. et al, 1998)。菊花 *At* 转化系统于 1995 年建立 (Fukai S. et al, 1995) 并在同年通过转 *Bt* 基因获得抗虫得菊花 (Dolgov S.V. et al, 1995)。1996 年, Elomaa P. 等将 *Chs* 转入非洲菊, 获得花色变异的菊花 (Elomaa P. et al, 1996)。1995 年康乃馨转 *EFE* 后延长了瓶插寿命 (Bovy A.G. et al, 1995)。1995 年, Suginuma C. 等龙胆导入 *Ar* 后改变株形。燕子海棠在 1998 年转 *Prla* 后获得抗病毒植株 (Aida R. et al, 1998)。高原龙胆在 1997 年转 *CHA* 改变花色 (Ledger S.E. et al, 1977) 1995 年 Handa T. 等转 *Ar* 改变花形株形。蓝猪耳 1995 年转 *Prla* 获抗病毒的性能 (Aida R. et al, 1998)。2000 年, 曾荣华等将 *IPT* 基因导入水仙体内, 表达后延缓叶片衰老。

1.2.2 直接转化法

植物基因直接导入技术是一种不需要借助载体而把带有目的基因的 DNA 或基因直接导入植物体或离体细胞、组织、器官中的一种基因工程技术。该方法简单且达到了转化目的。在观赏植物中取得成功的方法有花粉管导入法、花粉转化法、基因枪法、PEG 法、粒子轰击法等。主要在单子叶花卉植物中进行。1995, Tunen A.J. 等在百合中采用花粉转化法将 *MADS* 转入百合, 改变百合的花形花色。1995 年, 通过花粉转化法将 *CyMv* 导入兰花获得抗病毒兰花 (Kuehnle A.R., 1996)。1995 年, 谢永祥等建立蝴蝶兰花粉管导入转化系统和基因枪转化系统。1997 年, 通过粒子轰击唐菖蒲导入 *Uida*, 获得抗病毒植株 (Kamo K. et al, 1997)。

1.3 植物基因克隆技术的的研究进展

植物的生长发育是在多种代谢和生理过程基础上所发生的基因在时空上表达的综合现象, 开发和分离潜在的各种有价值的基因并深入研究其表达机理, 对作物品种的改良具有重要意义。但植物种类繁多, 基因组所包含的遗传信息量大而丰富, 据估计植物基因的总数达 5×10^6 以上。在遗传背景不很清楚条件下, 要从这样种类繁多的基因群体中, 克隆基因决非一件容易的事。然而过去的数十年中, 植物发育、生理生化和遗传等学科的迅速发展, 人们积累了大量关

于植物优良性状基因的遗传学和生物学基础知识,酶学和生物技术的发展为克隆植物基因提供了有效的手段。

1.3.1 根据已知基因的序列克隆植物基因

当已知目的基因的序列时,经常采取 PCR 方法克隆该基因。基本方法是根据目的基因的序列设计并合成一对引物,从植物中提取 DNA(RNA 需要在逆转录酶的作用下合成 cDNA 的第一条链),进行 PCR 扩增,扩增的片段纯化后连接到合适的载体上,用酶切分析和序列分析检测重组子,并与已知基因序列进行比较。

当目的基因的序列未知,可依据序列同源性通过 PCR 克隆基因。此方法依据生物的种、属之间编码基因序列的同源性高于非编码区的序列,在其它种属的同源基因被克隆的前提下,设计一对同源性高的引物,从目的植物 cDNA 文库或基因组文库,以 PCR 方法筛选目的克隆。国内,马德钦等根据文献报道的甜菜碱醛脱氢酶(*BADH*)基因的序列作了菠菜甜菜碱醛脱氢酶基因的克隆和序列分析(1996)。根据 Masumura 等(1989)发表的 10 KD 水稻醇溶蛋白基因序列合成一对引物,王广立克隆了水稻 10 KD 醇溶蛋白基因(1994)。忻骅分析了几个已知小麦高分子量谷蛋白基因,发现一段 DNA 序列在小麦不同的种中同源性达 100%,利用该片段核苷酸作为探针,从小麦的基因文库中分离出小麦谷蛋白基因(1992)。

1.3.2 根据植物基因表达的产物蛋白质克隆基因

对于有些性状的基因序列是未知的,但其生理生化及代谢途径研究比较清楚。通常采用这种方法进行克隆该类性状的基因,又称功能克隆。它是根据性状的基本生化特性这一功能信息,在鉴定和已知基因的功能后克隆。其具体作法是:在纯化相应的编码蛋白后构建 cDNA 文库或基因组文库,DNA 文库中基因的筛选根据情况主要可用二种办法进行,(1)将纯化的蛋白质进行氨基酸测序,据此合成寡核苷酸探针从 cDNA 库或基因组文库中筛选编码基因,(2)将相应的编码蛋白制成相应抗体探针,从 cDNA 入载体表达库中筛选相应克隆。功能克隆是一种经典的基因克隆策略,很多基因的分离利用这种策略。

早在 1985 年, Hain 等就从葡萄中克隆了两个编码白藜芦醇合成的二苯乙烯合成酶基因(*Vst1* 和 *Vst2*),葡萄中抗菌化合物白藜芦醇的存在,可以提高对灰

质葡萄孢(*Botrytis cinerea*)的抗性,在烟草和其它一些植物中无二苯乙烯合成酶,因此克隆该基因经过转基因后,对有些植物产生对灰质葡萄孢的抗性很有意义。Kondo 等 1989 年对编码水稻巯基蛋白酶抑制剂的基因组 DNA 做了克隆和序列分析。周兆澜构建了水稻 cDNA 文库,分离了编码水稻巯基蛋白酶抑制剂的 cDNA (1996)。植物蛋白酶抑制剂是一类天然的抗虫物质,它可抑制摄食害虫对蛋白质的消化,使害虫因缺乏所需氨基酸而导致非正常发育或死亡。王春香等从感病的烟草叶片中分离纯化了马铃薯 X 病毒(potato virus X, pvX),克隆了完整的马铃薯 X 病毒外壳蛋白基因,并将外壳蛋白基因转入马铃薯中,以期获得抗 pvX 病毒的栽培种马铃薯 (1991)。病毒外壳蛋白(Coat protein, cp)基因的成功克隆,可使转基因植物中产生病毒外壳蛋白基因介导的抗性(Coat Protein Mediated Resistance, CPMP)或病毒 CP RNA 介导的抗性。Vankan 报道从真菌中成功的克隆出无毒基因 Avr9,可直接利用此基因介导广谱高效的基因工程植物(1991)。功能克隆的特点是用基因表达的产物蛋白质来克隆基因、虽然某一性状的编码基因是未知的。如果对其生理生化及代谢途径研究的比较清楚,就可以分离和纯化控制该性状的蛋白质。因此功能克隆的关键是分离出一个纯度很高的蛋白质。只要有一个纯的蛋白质,得到十分特异的探针,这一策略是行之有效的。

1.3.3 基因标签法

该法是利用转座子或 T-DNA 插入植物的基因组中引起某一基因失活产生一些突变体,然后用相应转座子或 T-DNA 对突变体文库进行筛选,以选到的阳性克隆片段为探针,再筛选野生型植物的基因文库分离目的基因。如将一株带有功能的转位因子系统的植物与另一株在遗传上有差异的同种植物杂交,在杂交后代中筛选由于转位因子插入到某一特定基因序列中导致表型破坏或改变的突变株,用该纯合突变株构建基因文库,然后将转位因子用同位素标记作探针,从该文库中筛选出带有同源转位因子的目的基因。该法主要限于二倍体的自花授粉作物如玉米、金鱼草等。

通常用于克隆植物基因的转座子有玉米的 Ac、Mu、Smp 和 Ds 等。用转座子标记法进行植物基因的分离,首要的是把 Ac 等转座子转化到要进行基因克隆的植物中,目前多数是利用土壤农杆菌介导的转化系统把转座子导入目标植物中 (Keller et al, 1993; Bancroft et al, 1993)。目前已在玉米、烟草、番茄

等植物中克隆出抗性基因 (Jonhal et al, 1992;Whitham et al, 1994;Jones et al, 1994)。Johal 和 Brigg 分离出抗灰色长蠕孢(*Helminthosporium carbonum*)1 号小种玉米的 HMI 特异真菌抗性基因。该基因存在于玉米的抗性品种中,能够分解长蠕孢 1 号小种产生的对玉米具特异致病性的 HC 毒素,该基因编码 HC 毒素脱毒酶可使植物具有抗病性 (Johal et al, 1992)。Kenneth 等 1989 年利用 T-DNA 插入标记培育出拟南芥矮化突变体。

1.3.4 定位克隆

以图谱为基础的定位克隆技术在分离未知产物的基因方面有广阔的应用前景。该法的基本前提是基因定位,然后以紧密连锁的分子标记如 RFLP 等为起点,通过染色体步移逐步向目标基因靠近,最终克隆基因。其主要步骤包括:(1)将目标基因定位在高密度的分子标记连锁群上;(2)利用 PFGE 将连锁标记的遗传图距转换成物理距离;(3)构建 YAC 文库,找到含连锁标记的 YAC 克隆,并通过克隆的排序获得目标基因的 DNA 片段;(4)通过转化和功能互补试验证实基因所在的 DNA 片段。但是,在植物的基因组中,大量存在的 DNA 重复序列是染色体步移难以逾越的障碍。目前,以 PCR 为基础的分子标记(RAPD、DAF、AFLP)在许多方面补充和替代了 RFLP 标记,使植物分子连锁图谱标记的密度大大提高,实现了对基因的精细定位。

目前已在番茄、烟草、大麦、水稻、大豆、玉米等植物中发现了与抗病基因紧密连锁的 RFLP 标记并构建了遗传图谱 (Figdore et al, 1988;Heun et al, 1991;Smith,1991;Diers et al, 1992)。用这种方法已分别克隆到拟南芥菜、番茄、水稻等植物中的有关抗病基因 (Martin et al, 1993; Mindrnos et al, 1994;Wenyan et al, 1995)。Martin 等 1993 年最早用定位克隆技术克隆出番茄 *pto* 基因, *pto* 基因负责对带有无毒基因 *Avrpto* 的细菌,丁香假单胞菌 (*pseudomonas syringae* pv)菌株的抗性, *Pto* 基因导入感病番茄后转基因植株增强了对病原菌的抗性。Wenyuan 等 1995 年用这一技术克隆了水稻 *Xa21* 基因, *Xa21* 基因对真菌 *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* (Xoo) 具有抗性。

1.3.5 缺陷互补

许多研究表明,植物的许多基因可与细菌和酵母的突变体互补,来自拟南芥的 cDNA 文库可与酵母的 8 个营养缺陷突变体互补,因此,通过功能互补这一表

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库